



## Sakrapport

### Mätningar av läkemedelsrester i blod och urin från utter

---

Överenskommelse: 2219-16-032

Anna Roos, Katarina Loso och Johan Fång  
2017

---

Rapport 7:2017

Enheten för miljöforskning och övervakning  
Box 50007  
10405 Stockholm





## Mätningar av läkemedelsrester i blod och urin från utter

<p><b>Rapportförfattare</b> Anna Roos, Katarina Loso och Johan Fång</p>	<p><b>Utgivare</b> Enheten för Miljöforskning och övervakning, Naturhistoriska riksmuseet</p> <p><b>Postadress</b> Box 50007, 104 05 Stockholm</p> <p><b>Telefon</b> 08-51954111</p>
<p><b>Rapporttitel och undertitel</b> Mätningar av läkemedelsrester i blod och urin från utter.</p> <p>Överenskommelse Nr 2219-16-032</p>	<p><b>Beställare</b> Naturvårdsverket 106 48 Stockholm</p> <p><b>Finansiering</b> 5321</p>
<p><b>Nyckelord för plats</b> Limniska miljöer, Sverige</p>	
<p><b>Nyckelord för ämne</b> Utter, urin, blod, läkemedelsrester.</p>	
<p><b>Tidpunkt för insamling av underlagsdata</b> 2009-2016</p>	
<p><b>Sammanfattning</b></p> <p>Denna rapport är den första delen av två i en pilotstudie om läkemedelsrester i utter. I den första delen ville vi undersöka om det gick att analysera rester av läkemedel i urin och blod från utter, samt att utvärdera vilken matris som är mest lämplig för ändamålet.</p> <p>Vi har analyserat 30 olika läkemedelsrester i blod och urin från 20 poolade prover som innehöll blod respektive urin från 33 uttrar. Samtliga läkemedel fanns i blod och/eller urinprover, dock inte i alla prov. Ett flertal ämnen låg under kvantificerbar nivå (&lt;LOQ). Det innebär att man kan se att de finns i provet men pga "brus" inte kan kvantificera det.</p> <p>Det antidepressiva medlet Venlafaxin fanns i samtliga tio blodprover (0,24-2,0 ng/g färskvikt) men inte alls i urinproverna. Risperidone som används vid behandling av bl.a. schizofreni fanns i mätbara halter i 7 av de 10 blodproven (4,3-250 ng/g färskvikt) och 7 av 10 urinprov (0,12-46 ng/g färskvikt).</p> <p>Högst antal läkemedelsrester i urinet hade en utter från Västervik (11 st + 4 st &lt;LOQ). Den hade också mätbara halter från 7 olika läkemedelsrester i blodet (+ 4 st &lt;LOQ).</p> <p>Det fanns fler mätbara läkemedel i urinproverna jämfört med blodproverna, med ett undantag (Venlafaxin). Dessvärre är urin begränsande, de flesta uttrar som inkommer till museet har tom eller nästan tom urinblåsa. Att blodprov ändå fungerar bra är positivt. Det är oftast möjligt att ta blod från uttrarna som skickas in och därför föreslår vi att man i fortsättningen analyserar blod, och urin bara i de fall där det är möjligt.</p>	

# Innehållsförteckning

Innehållsförteckning .....	4
1. Bakgrund .....	5
2. Material .....	5
3. Analysmetod.....	6
4. Analysresultat läkemedel och diskussion.....	7
6. Referenser.....	9
Appendix .....	10

# 1. Bakgrund

Enligt JL §25, JF §33,36 ska man rapportera till polisen eller direkt till Naturhistoriska riksmuseet (NRM, tel 08-5195 4000) om man hittar en död uttrar. Polisen skickar kroppen till NRM i Stockholm, eller i vissa fall till Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) i Uppsala. När SVA har obducerat uttern skickas kroppen vidare till NRM. Antalet döda uttrar som inkommer till NRM har stadigt ökat ända sedan början av 1990-talet. Numera inkommer uttrar från i stort sett hela landet i ökande antal. Det innebär att urvalet av individer till olika miljögiftsrelaterade projekt har ökat markant och att man i dag kan studera miljögiftsbelastningen i uttrar från hela landet samt använda uttrar som hjälp till att finna förorenade områden. Uttern är stationär och man kan anta att halter i uttrar återspeglar halterna i miljön där den lever. Därmed är uttern en utmärkt representant för att studera miljögiftsbelastning fram för allt i den limniska miljön. På museet finns nu prover från över 1300 uttrar i museets miljöprovbanks. Museet sparar olika organ (muskel, lever, njure etc) till miljöprovbanks i fryst tillstånd och delar av skelettet för nutida och framtida forskning om bland annat miljögifter. Sedan några år tillbaka har vi även samlat blod och urin i syfte att kunna analysera bland annat läkemedelsrester. Tyvärr har de flesta uttrar som inkommer till museet tom eller nästan tom urinblåsa, men i de fall där det har varit möjligt har vi sparat urin.

De flesta uttrar som inkommer till museet har dött av mänsklig aktivitet (trafik eller fiske) och är i god kondition. Flertalet vuxna honor visar på nylig reproduktion [1], något som var mycket ovanligt för ett par decennier sedan. Däremot har merparten av hanarna (ca 70%) minst en cysta på sädesledarna något som kan härkomma från exponering av östrogen eller östrogenliknande substanser i fosterstadiet [2].

Läkemedel är biologiskt aktiva ämnen, som är skapade för att ge en (positiv) biologisk effekt till människor och djur med en medicinsk åkomma. Eftersom de är biologiskt aktiva substanser är det något som man inte vill hitta i naturen. Trots det har läkemedelsrester i miljön blivit ett ökande problem i många områden. Uttrar lever ofta i människors nära omgivning, och därför var vi intresserade att se om det fanns spår av läkemedel i vilda uttrar från Sverige.

Målet med studien var att undersöka om det fanns rester av läkemedel i urin och blod från uttrar, samt att utvärdera vilken matris av dessa två som är mest lämplig för ändamålet. Arbetet har utförts genom ett samarbete mellan Naturhistoriska riksmuseet (Anna Roos och Katarina Loso) samt IVL Svenska Miljöinstitutet (Johan Fång):

## 2. Material

Sammanlagt har blod och urin från 33 uttrar poolats till 10 blodprov och 10 urinprov och analyserats för 30 olika läkemedel, från antidepressiva medel, blodtrycksmedicin till astma och avsvällande medel. Tabell 1 visar en lista över de olika läkemedlen som ingår i studien och en översiktlig bild vad de används till. Tabell 1 i Appendix finns data över uttrarna i studien och var de kommer från.

Mängden urin har varit begränsande för studien, och därför har vi varit tvungna i flera fall att poola urin respektive blod från flera uttrar till ett prov. För denna delstudie har vi valt uttrar som påträffats inom en 20 km radie från ett vattenreningsverk (det vill säga de flesta som inkommit till museet) och har poolat ihop uttrar för att nå tillräckligt stor provmängd. Målet har varit att få ihop 20 mL urin, och 3 mL blod. Alla uttrar i studien är subadulta eller adulta hanar insamlade

mellan 2009-2016. En del av dem är ännu inte åldersbestämda. Samtliga är trafikdödade med ett undantag, en gammal utter som sköts vid en fiskeodling.

	Högt blodtryck	Epilepsi, alkohol-abstinens	Antidepressivt läkemedel	Ångstdämpande, narkotikaklassat	Anti-inflammatoriskt	Minskar magsyra, halsbränna o sura uppstötningar	Smärt-lindring	Schizofreni	Sänker kolesterol	Astma	Sömn-medel	Minskar vätske-uppbyggnad	Feber-nedsättande	Blod-förtunnande	Avsvällande
Atenolol	x														
Amlodipine	x														
Bisoprolol	x														
Caffeine															
Carbamazepine		x													
Citalopram			x												
Diazepam															
Fluoxetine				x											
Ketoprofen					x										
Metoprolol	x														
Norephedrine															x
omeprazol						x									
Oxazepam				x											
Paracetamol							x								
Propranolol	x														
Ranitidine						x									
Risperidone								x							
Sertraline			x												
Simvastatin									x						
Terbutaline										x					
Tramadol							x								
Venlafaxin			x												
Zolpidem											x				
Diclofenac					x		x								
Furosemide	x											x			
Hydrochlorothiazide	x											x			
Ibuprofen					x		x						x		
Naproxen					x		x						x		
Ramipril	x														
Warfarin														x	

Tabell 1. Lista över de läkemedel som ingår i studien och deras huvudsakliga användningsområde (efter Fass).

### 3. Analysmetod

Blod samt urin har tagits i samband med obduktion och sparats i miljöprovbanken (-25 grader C).

#### Upparbetning blod

Metoden är baserad på en metod för att undersöka ett humant blodprov för förekomsten av läkemedel [3]. Blod (3 g) från utter (*Luttra luttra*) vägs in ett polypropylenrör (14 mL) och spikas med isotopmärkt internstandardmix; [13C6]- diclofenac, [13C6]-hydroklorotiazid, [13C15N]-karbamazepin, [2D8]- ciprofloxacin och [2D3]-ibuprofen (50 µL, 2 µg/mL styck). Proven jämviktades över natt i kyl. Till proven tillsattes acetonitril/metanol (8:2, 6 mL) varpå det agiterades mekanisk (30 sekunder). Proven placerades i en frys (-20°C, 15 min) och centrifugerades därefter i en "swing-out" centrifug (3750 rpm, 15 min). Supernatanten dekanterades till ett nytt polypropylenrör (14 mL) och indunstades till 0,1 mL mha kvävgas och värme (ca 40°C). Därefter återlöstes proven i metanol/vatten (1:1, 1 mL) genom agitering (5 min) och sonikering (5 min), varpå proven placerades i frys (-20°C, 15 min). Proven centrifugerades (3000 rpm, 5 min) och dekanterades därefter till Eppendorfrör (1,5 mL) och centrifugerades (14000 rpm, 10 min). Proven överfördes till vial och injicerades på HPLC/MS/MS.

#### Upparbetning urin

Metoden är baserad på en metod för att undersöka vattenprov för förekomsten av läkemedel (Gros et al. 2006). Poolat urin (20 g) från utter (*Luttra luttra*) förs över till ett polypropylenrör

(50 mL) och spikas med isotopmärkt internstandardmix; [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]- diclofenac, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-hydroklorotiazid, [<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N]-karbamazepin, [2D<sub>8</sub>]- ciprofloxacin och [2D<sub>3</sub>]-ibuprofen (50 µL, 2 µg/mL styck). Proven jämviktades över natt i kyl. En solid phase extraction kolon (Oasis, HLB, 200 mg) med Filter Aid (ca 1 g) konditionerades; metanol (6 mL), MilliQ-vatten (6 mL) innan provet applicerades på kolonen (2 droppar/sekund). Därefter så tvättades kolonnen med vatten (2 mL) och torkades under vakuum (1 min). Kolonnen eluerades därefter först med metanol (5 mL) och sedan acetone (5 mL). Extraktet indunstades till torrhet mha kvävgas och värme (ca 40°C) och återlöstes i metanol/vatten (1:1, 1 mL) genom agitering (5 min) och sonikering (5 min). Proven överfördes därefter till Eppendorfrör (1,5 mL) och centrifugerades (14000 rpm, 10 min). Proven överfördes till vial och injicerades på HPLC/MS/MS.

Metoden för analys av läkemedel följde Gros *et al*, 2006 [4].

#### *Instrument*

Bestämning av läkemedel utfördes på en binär vätskekromatograf (UFLC) system utrustat med en autoinjektor (Shimadzu, Kyotu, Japan), kopplad till en API 4000 trippelkvadrupol (MS/MS) (Applied Biosystems, Foster City, USA) med ett elektroprayjonisering interface (ESI) i både positiv- och negativmod. Den kromatografiska separationen genomfördes med gradienteluering på en Xbridge (Waters Corporation, Milford, USA) C18-kolonn (50 x 3 mm, 5-mikron partikelstorlek) vid 35°C och ett flödes på 0,3 mL/min. Mobila fasen bestod av 10 mM ättiksyra i vatten (mobilfas A) och metanol (mobilfas B). Gradienten påbörjades med 100% mobilfas A och 0% av mobilfas B. Andelen mobilfas B ökades linjärt till 95% under 11 minuter och hölls konstant vid 95% i 5 minuter.

## **4. Analysresultat läkemedel och diskussion**

Elva av läkemedlen kunde inte kvantificeras i blodproverna: Citalopram, Fluoxetine, Ketoprofen, Metoprolol, Omeprazol, Oxazepam, Ranitidine, Sertraline, Simvastatin, Furosemide och Warfarin. Två av dessa, de ångestdämpande medlen Oxazepam och Furosemide sågs inte över huvud taget i något blodprov, men övriga läkemedel fanns i mätbara halter eller kunde detekteras men inte haltbestämmas (<LOQ), se tabell 2. Oxazepam fanns dock i flera urinprov (nr 2, 3, 5 och 6) i halter <LOQ, även Furosemide fanns i mätbara halter i prov nr 5 och 10.

Värt att notera är att blodproverna utgörs inte alltid av samma uttrar som urinproverna. I vissa pooler har en eller två uttrar utgått i den ena poolen, pga provbrist.

Det antidepressiva medlet Venlafaxin återfanns i samtliga blodprov (0,24-2,0 ng/g färskvikt) men inte i något urinprov. Risperidone (mot schizofreni) fanns i 7 av blodproven (4,3-250 ng/g färskvikt) samt i ytterligare ett blodprov (<LOQ). Det återfanns i 7 urinprov (0,12-46 ng/g färskvikt) och inte alls i tre.

Störst antal mätbara läkemedelsrester i urin hade prov 3 (11 st + 4 st <LOQ). Det innehöll urin från en enda utter, som kom från Västervik, Kalmar län. Den uttern låg också i topp vad gäller antal läkemedelsrester i blodprovet (7st) tillsammans med prov 8 som också hade 7 olika läkemedel i blodet (+6 st <LOQ). Prov 8 innehöll blodprov från 5 uttrar från Uppsala och Stockholms län. Sju av blodproverna innehöll mätbara halter av 6-7 läkemedel; prov 3

(Västervik), prov 5 (Stockholm och Uppsala), prov 6 (Gävleborg, Norrbotten och Södermanland), prov 7 (Örebro och Östergötlands län) samt prov 8.

Fem av urinproverna hade 6-11 läkemedel: prov 2 (Jönköpings län), prov 3 (Västervik, Kalmar län), prov 4 (Skåne och Norrbotten), prov 5 (Uppsala och Stockholms län), och prov 9 (Kalmar och Kronobergs län).

Sammanfattningsvis så fanns det fler mätbara läkemedel i urinproverna jämfört med blodproverna, med ett undantag (Venlafaxin). Desvärre är urin begränsande, de flesta uttrar som inkommer till museet har tom eller nästan tom urinblåsa. Analysen kräver minst 20 ml urin och då måste man poola flera uttrar. Att blodprov ändå fungerar bra är positivt. Det är oftast möjligt att ta blod från uttrarna som skickas in och därför föreslår vi att man i fortsättningen analyserar blod, och urin bara i de fall där det är möjligt.

	Blod				Urin			
	Finns i antal prov	range (ng/g vv)	antal <LOQ	antal <LOD	Finns i antal prov	range (ng/g vv)	antal <LOQ	antal <LOD
Atenolol	3	2,0-6,3	0	7	5	3,4-32	0	5
Amlodipine	2	0,06-0,096	2	6	0		3	7
Bisoprolol	2	0,33-1,2	3	5	4	0,038-0,10	2	4
Caffeine	4	0,5-1,0	3	3	3	3,5-11	3	4
Carbamazepine	1	0,12	1	8	2	0,10-0,15	1	7
Citalopram	0		5	5	0		5	4
Diazepam	1	0,11	3	6	0		3	7
Fluoxetine	0		3	7	1	0,0062	3	6
Ketoprofen	0		1	9	0		2	8
Metoprolol	0		3	7	3	0,034-0,059	2	5
Norephdrine	2	3,0-12	0	8	1	14	3	6
Omeprazol	0		2	8	1	0,03	5	4
Oxazepam	0		6	4	0		4	6
Paracetamol	2	9,9-18	1	7	4	2,8-61	3	3
Propranolol	2	0,068-0,1	4	4	1	0,06	2	7
Ranitidine	0		1	9	2	2,2-3,5	1	7
Risperidone	7	4,3-250	1	2	7	0,12-46	0	3
Sertraline	0		1	9	0		0	10
Simvastatin	0		1	9	3	0,71-5,3	2	5
Terbutaline	1	1,6	1	8	2	0,1-350	1	7
Tramadol	2	0,013-0,024	0	8	5	0,049-0,28	4	1
Venlafaxin	10	0,24-2,0	0	0	0		0	10
Zolpidem	1	0,11	4	5	1	0,03	1	8
Diclofenac	3	0,16-0,82	1	6	6	0,052-0,23	0	4
Furosemide	0		0	10	2	0,048-0,12	0	8
Hydrochlorothiazide	3	0,03-0,1	3	4	3	0,018-0,022	2	5
Ibuprofen	4	0,15-0,21	5	1	6	0,016-0,069	4	0
Naproxen	3	0,059-0,2	3	4	0		3	7
Ramipril	2	0,04-0,1	4	4	1	0,017	2	7
Warfarin	0		5	5	0		2	8

Tabell 2. Resultat från 10 blod- och 10 urinprover. Antal prover som hade mätbara halter av ett visst läkemedel visas, liksom min och max koncentration. Antal prov med halter <LOQ och <LOD visas också.



## 6. Referenser

1. Roos A, Bäcklin B-M, Helander B, Riget F, Eriksson U. Improved reproductive success in otters (*Lutra lutra*), grey seals (*Halichoerus grypus*) and sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) from Sweden in relation to concentrations of organochlorine contaminants. *Environmental Pollution*. 2012;170:268-75. doi: doi:10.1016/j.envpol.2012.07.017.
2. Roos AM, Ågren EO. High Prevalence of Proposed Müllerian Duct Remnant Cysts on the Spermatic Duct in Wild Eurasian Otters (*Lutra lutra*) from Sweden. *PLoS One*. 2013;8(12):1-5. doi: doi:10.1371/journal.pone.0084660.
3. Vincenti M, Cavanna D, Gerace E, Pirro V, Petrarulo M, Di Corcia D, et al. Fast screening of 88 pharmaceutical drugs and metabolites in whole blood by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013;405(2):863-79. doi: 10.1007/s00216-012-6403-y.
4. Gros M PM, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 2006;70:678-90.

# Appendix

Tabell 1. Lista över de uttrar som ingår i studien, uppdelade på provnummer.

Blodprov	Urinprov	Accnr	Döds- orsak	Ålder	År	Kön	Lokal	Lsk	Län
Prov 1	Prov 1	A2012/05385	TD	Adult	2012	M	Nässjö kommun, Lv 964 Johannesberg	SM	Jönköpings län
Prov 2	Prov 2	A2015/05710	TD	Subadult	2015	M	Breviksvägen i Eksjö, i höjd med sjukhuset	SM	Jönköpings län
Prov 2	Prov 2	A2015/05520	TD	Subadult	2015	M	Rv31, Vetlanda, Furudal	SM	Jönköpings län
Prov 2	Prov 2	A2012/05920	TD	Adult	2012	M	Aneby, Lommaryds socken, Hässlemed 1:1.	SM	Jönköpings län
Prov 2	Prov 2	A2014/05475	TD		2014	M	200 m syd korsning Rv31 och gamla Rv 31 Rödjenäs	SM	Jönköpings län
Prov 3	Prov 3	A2014/05203	TD	Adult	2014	M	Almvik, E22, Västervik	SM	Kalmar län
Prov 4	Prov 4	A2013/05513	TD	Adult	2013	M	Bröd, Träne	SK	Skånes län
	Prov 4	A2010/05270	TD	Subadult	2010	M	E22, Vändplats Vramsta, Tollarp, Kristianstad	SK	Skånes län
	Prov 4	A2010/05309	AV	Adult	2010	M	Överkalix, Karkjärv	NB	Norrbottnens län
Prov 5	Prov 5	A2013/05616	TD	Adult	2013	M	Solö, Lv 278, Hysingsvik	UP	Uppsala län
Prov 5	Prov 5	A2014/05625	TD	Adult	2014	M	Länsväg 276/Singö Handel/avfart Skärgårsvägen, Åkersberga, korsningen Isättravägen	UP	Uppsala län
	Prov 5	A2009/05307	TD	Adult	2009	M	Lv76, Norrtorp, Edebro, Hallstavik	UP	Stockholms län
Prov 6	Prov 6	A2014/05400	TD	Subadult	2013	M	E4 Högländsnäs, 3 km N, Pitsund, Piteå	NB	Norrbottnens län
Prov 6	Prov 6	A2010/05297	TD	Subadult	2010	M	RV 94, vid pålträsk, luleå, Älvsbyn	NB	Norrbottnens län
Prov 6	Prov 6	A2015/05232	TD		2014	M	Mellan Ljusne och Vallvik, norr om Gävle	HS	Gävleborgs län
	Prov 6	A2013/05568	TD	Adult	2013	M	Lv 53 vid Akaren, Bråhovda sjön (7 km innan Malmköping)	SÖ	Södermanlands län
Prov 7	Prov 7	A2010/05449	TD	Adult	2010	M	1 km S avfart 108, Ekeby, Kumla, på E20 strax utanför Kumla	NÄ	Örebro län
Prov 7	Prov 7	A2014/05553	TD		2014	M	Bromhult, Kinda kommun, Lv 539 5 km söder om Kisa	ÖG	Östergötlands län
	Prov 7	A2013/05468	TD		2013	M	Funnen på vägen i Zinkgruvan.	NÄ	Örebro län
	Prov 7	A2016/05092	TD		2015	M	Lv 134 mellan Vängsjön och Muggebo, Rimforsa, Kinda kommun	ÖG	Östergötlands län
Prov 8	Prov 8	A2013/05463	TD	Subadult	2013	M	Lv 982 ca 200 m från skylt "Gullinge by", Finsta, Norrtälje Hyttvreten, väster Gavle-Långsjön, Rånäs, Ålderskogen,	UP	Stockholms län
Prov 8	Prov 8	A2012/05919	TD	Adult	2012	M	Rimbo	UP	Stockholms län
Prov 8	Prov 8	A2014/05146	TD	Subadult	2013	M	Rv 77, busshållplats Björkboda, Norrtälje, Finsta	UP	Uppsala län
Prov 8	Prov 8	A2014/05001	TD	Subadult	2014	M	Kundby, Rimbo, Lv77.	UP	Uppsala län
Prov 8	Prov 8	A2008/05080	TD	Subadult	2007	M	I höjd med Smara skola, Norrtälje, Edsbro	UP	Stockholms län
Prov 9	Prov 9	A2016/05135	TD		2014	M	Hagen, Locknevi, Vimmerby	SM	Kalmar län
Prov 9	Prov 9	A2016/05075	TD		2015	M	E22, Söderåkra	SM	Kalmar län
Prov 9	Prov 9	A2015/05358	TD		2015	M	Vid infarten till Olofsböle, Källstorp, Trekanten, Kalmar Rv 31 5,5 km syd avfarten Rv 28 norra sidan mot sjön	SM	Kalmar län
Prov 9	Prov 9	A2015/05641	TD		2015	M	Möckeln, Lenhovda, Gistebäck	SM	Kronobergs län
Prov 9	Prov 9	A2016/05493	TD	Subadult	2016	M	Rv 32, Silverslätten, Hultsfred.	SM	Kalmar län
Prov 10	Prov 10	A2014/05307	TD	Subadult	2014	M	Rv 66, Lima kyrka, Malung	DR	Dalarnas län
Prov 10		A2015/05240	AV	adult	2014	M	Fiskodlingen i Österdalälven i Gåsvarv, Älvdalens kommun	DR	Dalarnas län